

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
9. Jg., S. 133—135, März 1971

Automatische Bestimmung von Serum — Bilirubin

Von H. BARTELS und M. BÖHMER

Chemisches Laboratorium des Bürgerspitals Basel (Schweiz)

(Eingegangen am 30. Oktober 1970)

Es wird eine automatische Methode zur Bestimmung des Serum-Bilirubins beschrieben. Als Kupplungskomponente wird das mit Naphthalin-1,5-disulfonsäure stabilisierte Diazoniumsalz von 2-Chlor-4-nitroanilin verwendet, welches in Gegenwart eines Detergens mit Bilirubin reagiert. Die Reaktion ist sehr spezifisch und empfindlich. Die Reagenzien sind über Wochen stabil.

The automated determination of serum bilirubin

An automated method for serum bilirubin determination is described. Diazo-2-chlor-4-nitroaniline, stabilized with naphthalene-1,5-disulfonic acid, is reacted with bilirubin in the presence of a detergent. This reaction is highly specific, very sensitive and the reagents are stable for weeks.

Wenngleich der diagnostische Wert des Bilirubin-gehalts im Serum seit der Einführung routinemäßiger Enzymbestimmungen, insbesondere der Transaminasen, stark abgenommen hat, steht diese Bestimmungsmethode — was die Anzahl der durchgeführten Analysen betrifft — noch unter den zehn häufigsten. Die Methode der Bilirubinbestimmung ist insofern umständlich, als jeweils ein Leerwert bestimmt werden muß. Dadurch wird viel Serum benötigt, es muß jede Probe zweimal identifiziert werden und außerdem fallen noch Rechenoperationen an. In einer vorangegangenen Mitteilung (1) hatten wir darauf aufmerksam gemacht, daß die zum Nachweis dienende Kupplungsreaktion, welche bis anhin ausschließlich mit diazotierter Sulfanilsäure durchgeführt wurde, auch mit anderen Diazosalzen gelingt. Von den ausprobierten Salzen gab Diazo-2-chlor-4-nitroanilin dem Kupplungsprodukt den höchsten Extinktionskoeffizienten. Außerdem ist dieses Reagenz, wenn mit 1,5-Naphthalindisulfon-

säure als Anion stabilisiert wird, in saurer Lösung über mehrere Wochen haltbar, wenn es im Kühlschrank aufbewahrt wird. Als Akzelerator, der das unkonjugierte Bilirubin vom Eiweiß befreit, wurde das Detergens Ultravon, ein langkettiger methoxylierter Alkohol verwendet. Wegen der hohen Analysenfrequenz der Bilirubinbestimmung haben wir uns entschlossen, diese Methode mittels Automaten durchzuführen, wobei wir die Versuchsbedingungen gerade für die zwei gebräuchlichsten Automatentypen ausarbeiteten, nämlich für ein kontinuierlich und ein diskontinuierlich arbeitendes Gerät. Als Vertreter dieser zwei Klassen verwendeten wir einerseits den AutoAnalyzer der Firma Technicon und andererseits den C 4 der Firma Perkin Elmer.

Messung im AutoAnalyzer

Für den AutoAnalyzer ist das Fließschema für die Bestimmung des Gesamtbilirubins in Abbildung 1 dargestellt: Das Serum wird in einem mit Luft segmentierten Strom von 0,1N HCl verdünnt. Die Salzsäure enthält zudem das Reagenz: 5 mg/100 ml des mit Naphthalin-1,5-disulfonsäure stabilisierten Diazoniumsalzes von 2-Chlor-4-nitroanilin und 1% Detergens. Nach einer Reaktionszeit von etwa 4 Min. wird alkalische Tartrat-Lösung zugegeben und nach erneutem Passieren einer Mischspirale kann das Reaktionsprodukt in einer 15 mm Durchflußküvette bei 660 nm gemessen werden.

Anstatt des hier wiedergegebenen Fließschemas, welches pro Bestimmung etwa 60 µl Serum benötigt, wenn mit einer Analysengeschwindigkeit von 60 Analysen pro Stunde gefahren wird, kann für die Pädiatrie leicht ein solches konstruiert werden, welches nur 20 µl benötigt, indem alle Schläuche durch solche ersetzt werden, deren innerer Durchmesser um $\frac{2}{3}$ kleiner ist. Ein solcher Schlauchsatz ist jedoch sehr empfindlich auf Verstopfungen und hat sich in unserem Labor, in dem

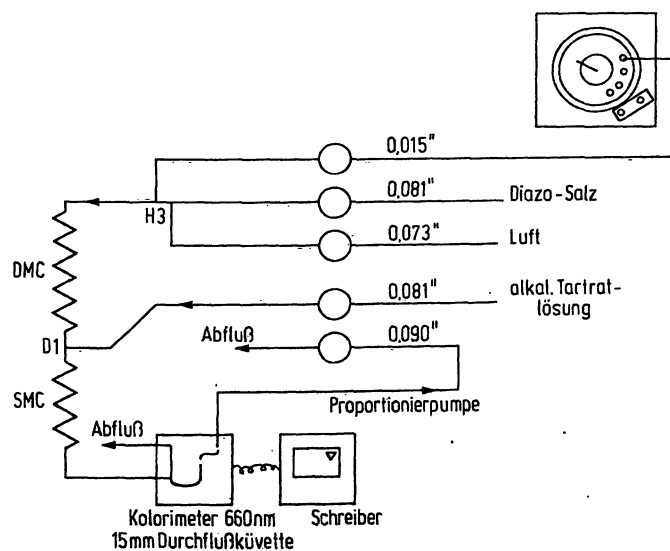


Abb. 1

Fließschema für die Bestimmung des Gesamtbilirubins

es eher darauf ankommt, schnell zuverlässige Resultate zu produzieren, als mit sehr kleinen Problemengenen auszukommen, nicht so sehr bewährt. Wie bei den Analysenverfahren mit kontinuierlich fließendem Reagenzienstrom überhaupt, tritt auch bei dieser Methode eine verhältnismäßig hohe Kontamination durch die vorangehende Probe auf, so daß man bei einer Analysengeschwindigkeit von 60 Proben pro Stunde stark ikterische Seren mit einem Bilirubingehalt von mehr als 10 mg/100 ml, die man gut von Auge erkennen kann, mit Vorteil am Ende der Serie konzentriert. Bis zu einer Konzentration von 15 mg/100 ml Bilirubin kann mit dem aufgezeigten Schlauchsatz direkt analysiert werden. Bei höheren Konzentrationen muß mit physiologischer NaCl-Lösung 1:2 verdünnt werden.

Das angegebene Diazosalz des 2-Chlor-4-nitroanilins zeichnet sich nicht nur durch einen hohen Extinktionskoeffizienten des entsprechenden Diazosalzes aus, sondern auch durch einen niedrigen Leerwert des Bestimmungsansatzes. Dank der langwelligen Absorption, dem hohen Verdünnungsgrad und dem Zusatz des dispergierenden Ultravions kann mit dem angegebenen Schlauchsatz kein Leerwert gefunden werden, wenn die Seren klar sind. Bei lipämischen Seren lag der vorgetäuschte Wert bis 0,3 mg/100 ml Bilirubin solange die Seren nicht aufrauhnten (optische Dichte des Serums bis 2 Extinktionseinheiten bei 660 nm und 1 cm Schichtdicke). Aus diesem Grunde verzichteten wir auf die Bestimmung eines Leerwertes. Bei Hämolyse stört zwar die Eigenabsorption des Hämoglobins wegen der langwelligen Absorption des Reaktionsproduktes nicht mehr. Wegen der ähnlichen chemischen Eigenschaften von Bilirubin und Hämoglobin ist es jedoch schwierig eine Diazokomponente zu finden, die ausschließlich mit Bilirubin reagiert. So wird auch die hier beschriebene Nachweisreaktion des Bilirubins gestört: bei 1 g Hämoglobin/100 ml Serum tritt eine 10proz. Hemmung der Reaktion auf.

Problematisch — wie bei allen Bestimmungsmethoden für Bilirubin — ist die Standardisierung des Verfahrens. Da mit dem AutoAnalyzer nur Relativwerte erhalten werden, braucht es eine Bezugsgröße, anhand der die anfallenden Transmissions-Peaks in Konzentrationen umgerechnet werden können. Wir beschritten zwei unabhängige Wege: Einerseits benützen wir verschiedene Kontrollseren der Firma Merz & Dade. Aus den deklarierten Konzentrationswerten von Monitrol I und II einerseits und den nach Reaktion gemessenen Transmissionen andererseits, kann eine Standardkurve konstruiert werden. Zudem erhalten wir durch Mischen von normalem Mischserum mit Serum von Austauschblut von Säuglingen mit Kernikterus eine Verdünnungsreihe, die wir tiefgefrieren und deren Bilirubingehalt mit einem absolut messenden Verfahren (1) bestimmt wurde.

Die Richtigkeit der mit dieser Technik erhaltenen Werte kann durch Parallelbestimmung mit einer Referenzmethode und durch den Variationskoeffizienten belegt werden.

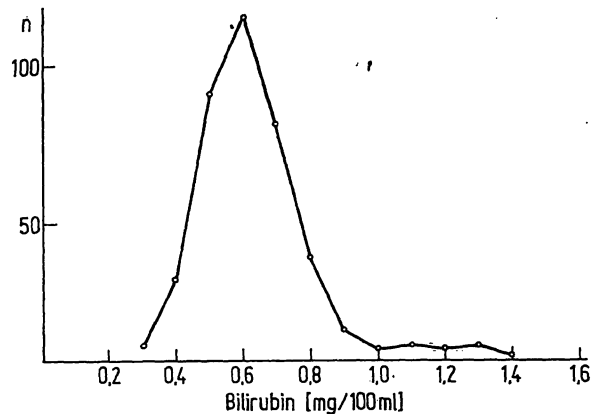


Abb. 2
Darstellung des Normalwertes: Häufigkeitsverteilung von Bilirubinwerten für $n = 234$ Blutspender

Als Referenzmethode wählten wir die herkömmliche Kupplung mit diaotierter Sulfanilsäure (Testpackung Boehringer). Der Korrelationskoeffizient für $n = 131$ Patientenseren mit einem Bilirubingehalt von 0,2 bis 9,6 mg/100 ml ergab sich zu $r = 0,985$, so daß die vom Mediziner geübten Interpretationsmöglichkeiten keine Änderung erfahren. Der Normalwert wurde durch Analyse von $n = 234$ Blutspendern bestimmt. Die erhaltene Verteilung ist in Abbildung 2 wiedergegeben und stimmt recht gut mit anderen ähnlichen Untersuchungen überein (2).

Messung im C4-Automaten

Bei der Messung im C4-Automaten der Perkin Elmer wurden 0,2 ml Serum mit 1 ml Diazolösung gemischt und während 4 Min. inkubiert. Anschließend wurde 1 ml alkalische Tartrat-Lösung zugesetzt und in die Meßküvette überführt. Unmittelbar nach dem Überführen des Meßgutes in die Küvette stiegen wegen des Zusatzes von Ultravon Luftblasen aus der Lösung auf. Durch Benützen der Küvette in Position 4 verstreicht zwischen der Überführung des Meßgutes von dem Reaktionsbecher in die Küvette und der Farbmessung genügend Zeit, um alle Luftbläschen aus der Lösung aufsteigen zu lassen. Bei wiederholter Analyse einer Serie von $n = 80$ Patientenseren ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,987$, was für die Güte der Meßtechnik spricht. Ein Vergleich der beiden Analysenmethoden: einerseits bei Verwendung des diskontinuierlichen C-4 Automaten und andererseits des mit kontinuierlicher Technik arbeitenden Auto-Analyzer gibt bei $n = 100$ Patientenseren einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,985$.

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zur Bestimmung des Gesamtbilirubins beschrieben, die sich gegenüber den bisher verwendeten Methoden durch eine Anzahl von Vorteilen auszeichnet. Von der chemischen Seite her verdient die Tatsache Beachtung, daß das hier verwendete Reagenz, diaotiertes 2-Chlor-4-nitroanilin, recht spezifisch ist. Selbst bei einer

Hämoglobinkonzentration von 1 g/100 ml Serum wird nur eine 10proz. Hemmung beobachtet. Eine Beeinflussung des Meßwertes durch das Hämoglobin selbst tritt nicht mehr auf, da im langwelligen Bereich gemessen wird. Die Möglichkeit, bei 660 nm zu messen, hat weiterhin den Vorteil, daß kein Leerwert bei klaren Seren mehr auftritt; durch den Zusatz des Detergens Ultravon werden selbst stark lipämische Seren weitgehend dispergiert. Für orientierende Untersuchungen genügt es, den Vollwert zu messen.

Auf technischer Seite besticht die gute Haltbarkeit des Reagenzes und die dank des hohen Extinktionskoeffizienten des basischen Kupplungsproduktes geringe Probenmenge, die zur Durchführung der Analyse benötigt wird. Das das Serumeiweiß denaturierende Detergens bewirkt eine schnelle Dissoziation des unkonjugierten Bilirubins, so daß bereits eine Reaktionszeit von 4 Min. ausreicht. Zudem kann auf den niedrigen Preis der Reagenzien hingewiesen werden.

Wegen der Stabilität der Reagenzien, der Empfindlichkeit und der Spezifität der Reaktion und der guten Reproduzierbarkeit der Meßwerte mit den angegebenen Techniken dürfte diese Methode — mit oder ohne Leerwert — hauptsächlich dort eingesetzt werden, wo große Serien anfallen.

Reagenzien

Diazosalz 106 µM 2-Chlor-4-nitroanilin

50 mg des Diazosalzes von 2-Chlor-4-nitroanilin, stabilisiert mit Naphthalin-1,5-disulfonsäure, werden in 100 ml 1N HCl und 10 ml Ultravon JF gelöst und mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt. Im Dunkeln ist diese Lösung bei + 4° wenigstens 1 Monat haltbar. Ultravon JF ist bei der Ciba A. G. in Basel/Schweiz erhältlich. Das stabilisierte Diazoniumsalz kann nach (1) hergestellt werden. Ist dies nicht möglich, verwendet man mit Vorteil 2-Chlor-4-nitro-1-benzoldiazonium-2-naphthalinsulfonat von Fluka, CH 9470 Buchs, Katalognummer 74150 (7).

Alkalische Tartratlösung 0,3725M Tartrat, 0,625N NaOH (Fehling II)
105 g Kaliumnatriumtartrat und 25 g Natriumhydroxid werden mit dest. Wasser auf 1 l aufgefüllt.

Literatur

1. BARTELS, H. und M. BÖHMER, diese Z. 7, 444 (1969). —
2. DAVID, F., Praxis 41, 420 (1952).

Dr. H. Bartels
Chem. Laboratorium
CH 4000 Basel
Bürgerspital